

University of Groningen

Sorting of matrix proteins to peroxisomes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*

Salomons, Florian Albert

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2001

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Salomons, F. A. (2001). *Sorting of matrix proteins to peroxisomes in the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting

In tegenstelling tot bacteriën bevatten eukaryote cellen (bijvoorbeeld gist-, planten-, en menselijke cellen) door membraan omgeven compartimenten, ook wel organellen genoemd. Elk organel vervult een specifieke taak, die voor het functioneren en vermenigvuldigen van deze cellen essentieel is. In de celkern bijvoorbeeld, is de genetische informatie (DNA) opgeslagen, terwijl de mitochondriën de energieleveranciers zijn voor de cel, en in de vacuole of lysosoom wordt het afvalmateriaal gerecycled. Een complex netwerk van vesiculaire structuren (het endoplasmatisch reticulum en het Golgi-apparaat) activeert en modificeert eiwitten die door de cel worden uitgescheiden. Naast bovengenoemde celorganellen bevatten alle eukaryote cellen ook 'microbodies' (een algemene benaming voor peroxisomen, glyoxysomen en glycosomen). De functie van deze organellen is iets moeilijker te omschrijven. Microbodies hebben een eiwitrijke inhoud (de matrix) met daaromheen een enkele membraan. De matrix van microbodies kan worden omschreven als een sterk geconcentreerde oplossing van enzymen, die de fysiologische rol van het organel bepaalt. Echter, de samenstelling van de matrix kan erg divers zijn, en is afhankelijk van het organisme, het type cel, en - in gisten en filamenteuze schimmels - ook afhankelijk van de groei omstandigheden. Typische microbody enzymen zijn enzymen betrokken bij de β -oxidatie van vetzuren, waterstof peroxide producerende enzymen, catalase en enzymen van de glyoxylaats cyclus. Er bestaan ook microbodies met geheel verschillende functies. Een voorbeeld hiervan is het glycosoom, dat een volledige set van glycolytische enzymen bevat. Dit organel komt voor in trypanosomen, parasieten die de slaapziekte veroorzaken. Bij de mens bevatten levercellen veel microbodies, die een cruciale rol spelen bij de afbraak van

vetzuren. Ten gevolge van een erfelijke peroxisomale ziekte kunnen microbodies afwezig zijn, of niet goed functioneren. Dit heeft een ophoping van vetzuren in het lichaam van de patiënt tot gevolg, waardoor ernstige afwijkingen ontstaan met in sommige gevallen letale gevolgen. In planten zijn deze organellen belangrijk voor de mobilisatie en opslag van vetten gedurende de ontkieming van zaden, en in bladeren voor de fotorespiratie. In gisten en filamenteuze schimmels zijn microbodies essentieel voor de afbraak van verscheidene koolstof- en stikstofbronnen in het voedingsmedium (bijvoorbeeld alkanen, vetzuren, methanol, primaire amines). Er zijn maar weinig biosynthetische enzymen gevonden in microbodies. Bij de mens is dit type enzymen betrokken bij de ether-lipide en cholesterol biosynthese. Een ander voorbeeld zijn de peroxisomale enzymen die een rol spelen bij de penicilline biosynthese in *Penicillium chrysogenum*.

Ondanks de grote diversiteit in het functioneren van microbodies, vertoont de vorming van het organel (microbody biogenese) in verschillende eukaryote cellen grote overeenkomsten. Blijkbaar zijn de hierbij betrokken mechanismen sterk geconserveerd gedurende de evolutie. Daardoor kan de kennis, verkregen bij het onderzoek van eenvoudige organismen zoals gisten, nuttig gebruikt worden voor een beter begrip van de biogenese en het functioneren van microbodies in complexere, 'hogere' eukaryoten, zoals de mens.

In dit proefschrift wordt de studie van de moleculaire mechanismen, betrokken bij de vorming van peroxisomen in de methylotrofe gist *Hansenula polymorpha* beschreven. In deze gist worden de peroxisomen sterk geïnduceerd bij groei op methanol. Onder deze groeicondities bevatten de peroxisomen drie enzymen van het methanol metabolisme, namelijk alcohol oxidase (AO), dihydroxyacetone

synthase (DHAS) en catalase (CAT). Afhankelijk van het groeisubstraat kunnen ook andere enzymen aanwezig zijn in *H. polymorpha* peroxisomen. Wanneer deze gistcellen in de aanwezigheid van primaire amines groeien bijvoorbeeld, bevatten de peroxisomen amine oxidase (AMO) en CAT. Cellen die op media met glucose en ammoniumsulfaat groeien, hebben alleen een paar kleine microbodies, omdat bij het metaboliseren van deze groeisubstraten geen peroxisomale enzymen nodig zijn. Echter, wanneer glucosegekweekte cellen worden overgeschakeld naar een medium met methanol, neemt het aantal en de omvang van deze organellen snel toe. Deze toename wordt veroorzaakt doordat nieuw aangemaakte peroxisomale enzymen worden geïmporteerd in een paar kleine microbodies, die oorspronkelijk aanwezig waren in de glucosegekweekte cellen. Het membraan van het organel wordt ook groter ten gevolge van de incorporatie van lipiden en membraaneiwwitten. Wanneer de microbody volgroeid is, ontstaat er een afsnoering die tot een nieuw organel uitgroeit.

In de afgelopen jaren is veel vooruitgang geboekt bij het onderzoek naar de moleculaire mechanismen van de vorming van het peroxisoom (matrixeiwit import, insertie van membraaneiwwitten, deling van het organel). Tot nu toe zijn 14 verschillende *H. polymorpha* genen (*PEX* genen) geïdentificeerd die bij verschillende aspecten van het vormingsproces betrokken zijn. Onlangs zijn ook de eerste *H. polymorpha* genen beschreven, die in de selectieve afbraak van peroxisomen functioneren (*PDD* genen). Hoofdstuk 1 van dit proefschrift geeft een overzicht van de belangrijkste recente resultaten van het onderzoek naar de moleculaire processen in de functie, ontwikkeling en afbraak van microbodies.

Een aantal onderzoeken heeft indirect aangetoond dat het endoplasmatisch reticulum (ER) een rol speelt bij de vorming van de peroxisomale membraan. Een hypothetisch model beschrijft dat

sommige peroxisomale membraaneiwwitten na synthese eerst naar het ER toegean. Vervolgens worden membraanblaasjes aan het ER gevormd, die deze membraaneiwwitten bevatten. Daarna fuseren deze membraanblaasjes met de reeds gevormde peroxisomen, zodat de nieuwe eiwwitten en membraancomponenten in het peroxisomale membraan worden opgenomen.

Om dit hypothetisch model in *H. polymorpha* te testen, werd gebruik gemaakt van brefeldin A (Hoofdstuk 2). Brefeldin A (BFA) is een door een schimmel geproduceerde toxine, dat de afsnoering van membraanblaasjes aan het ER blokkeert.

Elektronen microscopische analyse liet zien dat, na toevoeging van BFA aan *H. polymorpha* celcultures, de structuur van het ER veranderde. Maar, in methanolgekweekte gistcellen was ook duidelijk dat de vorming van peroxisomen werd gestoord. Met behulp van immunocytochemie werd aangetoond dat zowel de peroxisomale membraaneiwwitten (Pex3p en Pex14p) als de matrixeiwwitten (AO, DHAS, CAT en Pex8p) aan het ER accumuleerden. Blijkbaar worden specifieke membraaneiwwitten, die belangrijk zijn voor de ontwikkeling van het peroxisoom, eerst naar het endoplasmatisch reticulum gesorteerd. Hierna vindt transport naar de peroxisomen plaats met behulp van membraanblaasjes. In de aanwezigheid van BFA werd dit proces geblokkeerd, waardoor deze eiwwitten zich ophopen aan het ER. Die ophoping van membraaneiwwitten welke essentieel zijn voor matrixeiwit import (bijvoorbeeld Pex14p), verklaart waarom de peroxisomale matrixeiwwitten naar het verkeerde organel werden gedirigeerd.

Een aantal *PEX* genen (essentieel voor de vorming van peroxisomen) is betrokken bij de import van matrixeiwwitten. Ten eerste zijn er in het cytosol twee receptor eiwwitten (Pex5p en Pex7p) aanwezig die de specifieke sorteringssignalen van matrixeiwwitten herkennen. Pex5p is de receptor voor het carboxy-terminale peroxisomale

sorteringssignaal PTS1, terwijl Pex7p het PTS2 herkent in de amino-terminus van matrixeiwitten. Na binding in het cytosol van de receptoren aan nieuw gesynthetiseerde matrixeiwitten, worden de complexen gebonden aan het peroxisomale membraan door interactie van het receptor/cargo-complex en eiwitcomponenten van de 'docking-site'. Vervolgens wordt het matrixeiwit over het membraan getransporteerd. Of het receptoreiwit in deze stap ook over het membraan wordt gebracht, is nog onduidelijk. Uiteindelijk worden de receptoreiwitten terug naar het cytosol gerecycled om opnieuw aan een import cyclus deel te nemen.

Een deletie van het *PEX5* gen heeft tot gevolg dat de PTS1 eiwitten niet meer geïmporteerd worden. Onder condities waarbij PTS1 eiwitten worden geïnduceerd, maar het PTS2 eiwit AMO onderdrukt, zijn in *H. polymorpha pex5* cellen peroxisomale membraanresten aanwezig, die geen matrixeiwitten bevatten maar wel membraaneiwwitten. In hoofdstuk 3 wordt aangetoond dat deze membraanstructuren zich kunnen ontwikkelen tot een normaal peroxisoom door de opname van het nieuw gesynthetiseerde PTS2 eiwit AMO. Hiervoor werden de peroxisomale membraanstructuren in *H. polymorpha pex5* cellen voorzien van een specifiek label, namelijk een Pex10p.myc fusie-eiwit. Deze cellen werden voorgekweekt onder omstandigheden waarbij de Pex10p.myc gelabelde membraanstructuren werden geïnduceerd, maar waarbij de synthese van het PTS2 eiwit onderdrukt werd. Vervolgens werden deze cellen overgebracht naar een medium, waarbij het PTS2 eiwit AMO werd gesynthetiseerd en het *PEX10.MYC* gen niet meer tot expressie kwam. Biochemische en elektronenmicroscopische experimenten toonden aan dat na 2 uur peroxisomen aanwezig waren. Deze bevatten zowel het oorspronkelijke Pex10.myc als het nieuw geproduceerde AMO.

Verondersteld wordt, dat Pex14p een component is van de 'docking site' op het

peroxisomale membraan voor het receptor/cargo-complex. Dit is gebaseerd op de waarneming dat cytosolisch georiënteerde domeinen van Pex14p fysieke interacties aangaan met de receptor eiwitten Pex5p en Pex7p. Bovendien heeft een deletie van het *PEX14* gen tot gevolg dat zowel de PTS1, als de PTS2 eiwit import aanzienlijk worden belemmerd. Tegen de verwachting in resulteerde een overproductie van het PTS1 receptor eiwit Pex5p, in een *H. polymorpha pex14*-deletie stam, in een gedeeltelijk herstel van de PTS1 import (AO en DHAS), terwijl het PTS2 eiwit AMO niet werd geïmporteerd (Hoofdstuk 4). Dit toont aan dat het matrixeiwit importmechanisme ook zonder Pex14p kan functioneren, zij het met verminderde efficiëntie. Pex5p was in deze cellen aanwezig in het cytosol, maar accumuleerde ook aan de buitenkant van het peroxisomale membraan. Blijkbaar is Pex14p als een component van de veronderstelde 'docking site', niet persé nodig voor de associatie van Pex5p aan het membraan.

Een aantal studies (two-hybrid analyse en co-immunoprecipitatie) heeft aannemelijk gemaakt dat eiwitcomplexen aanwezig zijn in het membraan van peroxisomen. Een voorbeeld van een dergelijk eiwitcomplex is het veronderstelde 'docking site'-complex. Mogelijke componenten van dit complex zijn Pex13p, Pex14p en Pex17p. Andere eiwitcomplexen zouden kunnen functioneren bij insertie van eiwitten in het membraan en het transport van kleine moleculen. Echter, het bestaan van dit soort eiwitcomplexen is nog niet direct aangetoond. Met behulp van blue native gel electrophorese werden eiwitcomplexen van verschillende groottes gevonden in de peroxisomale membraan van methanolgeïnduceerde *H. polymorpha* cellen (hoofdstuk 5). Pex14p werd, samen met een aantal andere eiwitten, aangetoond in een eiwitcomplex van ongeveer 400 tot 500 kDa groot.

